

MTA SZTAKI és Országos Közegészségügyi Intézet

Különböző eredetű BCG vakcinák összehasonlító vizsgálata
statisztikai módszerekkel

Csáki Péter, Lugosi László, Bene Béla, Lovas Lászlóné,
Kutas Tibor és Kiss Györgyné

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) egyik fontos feladatának tekinti a TBC elleni harcot. Ennek egyik lényeges feltétele a kellően tartós hatású oltóanyaggal, a BCG vakcinával való folyamatos ellátás biztosítása. A világ különböző országaiban gyártanak BCG oltóanyagot, ezek minősége azonban különböző, sőt, az egyes gyártó helyeken időről időre is változhat. Ezért a WHO a gyártott vakcinákból rendszeresen mintát kér és ellenőrzi ezek minőségét. Fontos feladat a gyártási, tárolási, szállítás és értékmérési feltételek standardizálása, optimalizálása. A jelen munka célja az volt, hogy erre megfelelő javaslat kidolgozását tegye lehetővé. Budapesten az Országos Közegészségügyi Intézet BCG-Laboratóriuma a WHO felkérésére 1964 óta ellenőrző laboratóriumként rendszeresen folytatja a világ mintegy 40 helyéről származó liofil BCG-vakcina-minták ellenőrző vizsgálatát, valamint a különböző vizsgálati metodikák tesztelését. Az évek folyamán összegyűjtött nagy mennyiségű információ retrospektív, számítógépes feldolgozása és matematikai értékelése lehetővé tette, hogy megbízható módon végezzünk összehasonlításokat az eddigiekben kialakított vakcina-termelési és -értékelési módszerek között.

1. A BCG-vakcina értékmérése

A BCG-vakcina hatékonyságának alapvető feltétele, hogy a szervezetbe juttatott dózis elegendő mennyiségű élő baktériumot tartalmazzon ahhoz, hogy az immunrendszerből a védekező reakciót ki tudja váltani, de ne tartalmazzon aktív fertőzést előidéző nagy számú élő baktériumot. Ezenkívül az is lényeges, hogy a gazdaszervezetben az élőbaktériumok hosszú túlélési idővel sokáig biztosítsák az immunrendszer reakcióját. A vakcina minőségét ennek megfelelően kétféleképpen lehet vizsgálni:

a.) a gyártás folyamán egyes ampullákba kerülő ml-enkénti élőbaktérium-egységszám (ÉBE) alapján,

b.) az élő szervezetbe juttatva az immunizáló hatása, illetve ennek tartóssága alapján.

A jelen előadásban az ÉBE-vizsgálatok (a.) pont) alapján kapott eredményeket ismertetjük, bár a b.) pontban említett módszerrel is folytattunk vizsgálatokat.

A BCG ÉBE a következő módon határozható meg: az egyes ampullákból kivett mintákat először megfelelően fel kell hígítani, majd megfelelő konténerben elhelyezett táptalajra oltani. Több hetes inkubálás alatt a táptalajon az egyes BCG élőbaktériumok kolóniákat hoznak létre. Ezután a kapott kolóniák leszámolásával megbecsülhető az eredeti ampulla 1 ml-ében lévő ÉBE.

Az így becsült érték természetesen sok tényezőtől függ, nem adja meg pontosan az ampullában található ÉBE-t. Befolyásolja a becslést a hígítás pontossága, a táptalaj minősége, a leszámolás pontossága és még számos egyéb tényező is. Ezért vizsgálatainkat két kérdés köré csoportosítottuk:

1. A BCG vakcina egyes gyártási tételeinek minősége közötti eltérés,
2. a BCG-vakcina értékmérési metodikája.

Ezen kérdések vizsgálatához az ÉBE-t jellemző adatokon (a kolóniaszámokon) kívül többféle, egyéb információkat tartalmazó adatokat is rögzíteni kellett.

2. Az adatrendszer kialakítása

Az adatrendszer rögzítése több lépésben történt. Az első lépésben létrehozott file - és rekord - formátumot a későbbiek folyamán egy célszerűbb formára konvertáltuk. Az adatok ellenőrzését és javítását az első formátumban végeztük. A konvertálás magában foglalta a kódrendszer javítását, a rekordformátum átalakítását és egyes, a konvertáló program által leszámolt mennyiségek beírását.

Végülis a kialakított file-formátum a következő volt (a felsorolás nem teljes, itt csak a fontosabb adatokat tüntetjük fel):

általános információk	vizsgálat-szám
	származási helyek száma
	gyártási tételek száma
közös vakcina információk	származási hely (kódolt)
	vizsgálat célja (kódolt)
	gyártási tételszám (kódolt)
	ampullaszáma
	érkezési dátum
speciális vakcinainformációk	táptalaj, konténer (kódolt)
	leoltás időpontja
	hőkezelés időtartama
	higitás időpontja
	higitási szintek száma
	1. higitási szint
	konténerek száma
	2. higitási szint
	konténerek száma
	⋮
	kolóniák száma (konténerenként)

Az adatrendszer rögzítése után az összes adatokból és bizonyos statisztikai alapszámításokból áttekinthető táblázatokat készítettünk, amelyek segítségével tájékozódni lehet az alap- és kísérő-információk alakulásáról.

3. Az élőbaktérium-egységszám becslése

Az eredeti ampullák 1 ml-ébe jutó ÉBE-t az egyes táptalajokon (konténerekben) kinőtt baktérium-kolóniák alapján becsülhetjük. Egy ampullából több mintát veszünk, különböző szintű higitásokat készítünk és mindegyiket több konténerre oltjuk le. Ezek alapján a legegyszerűbb becslési mód a következő: egy adott ampullából ismeretes, hogy mennyi a táptalajokra leoltott összes (eredeti) térfogat, ezért (feltéve, hogy minden kolónia egyetlen élőbaktériumot képvisel) ezzel osztva az összkolóniaszámot, megkapjuk a kívánt becslést. Képletben:

$$\text{ÉBE} = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}}{v \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{d_i}} \quad /1/$$

ahol k a higitási szintek száma, d_1, \dots, d_k a higitási szintek, n_i az i -edik szinten a konténerek száma, x_{ij} az i -edik szinten a j -edik konténerben a kolóniák száma, végül v egy konténerre leoltott (higitott) térfogat. (Igy tehát d_i -szeresre higitás esetén v/d_i az eredeti térfogat.)

Ez a becslés feltételezi, hogy az eredeti térfogat valamilyen d -szeresre higitva az ÉBE a d -edrészére csökken. Ez nem mindig teljesül, ezért a WHO egy olyan becslési eljárást javasolt, amely az egyes higitási szinteken kapott kolóniaszámokat súlyozza, éspedig nagyobb súlyt ad (az adott körülményekre megállapított) "optimális" kolóniaszám közelében kapott értékeknek. Nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy melyik becslési elv ad helyesebb eredményt, ezért mindkét eljárást alkalmaztuk és ezeket - külön táblázatban feltüntetve - összehasonlítottuk. Ezeken kívül egy harmadik becslési eljárást is alkalmaztunk. T.i. az /1/ formula nem mindig használható. Ugyanis

tul magas kolóniaszám esetén csak azt lehet megállapítani, hogy az egy adott korlát felett van, azaz ilyenkor cenzurált leszámolást kellett alkalmazni.

Az egyes térfogategységekben az élőbaktériumok száma általában változik, így ezeket valószínűségi változóknak célszerű tekinteni. Cenzurált Poisson-eloszlást feltételezve, maximum likelihood módszerrel kaptuk harmadik becslésünket. Ha minden kolóniaszám az L korlát alatt van, akkor ez megegyezik az /1/ formulával, egyébként pedig a következő egyenlet gyökeként adódik

$$\lambda = \frac{\sum_{i=1}^k X_i + (n_i - m_i) G(\lambda/d_i)}{\sum_{i=1}^k \frac{n_i}{d_i}} \quad /2/$$

ahol d_i az i -edik higitás szintje X_i , n_i , m_i az i -edik szinten az L korlát alatt talált összkolóniaszám, az összes konténerek száma, illetve az L korlát alatti kolóniaszámokat tartalmazó konténerek száma, és

$$G(t) = t + L / \sum_{n=1}^{\infty} \frac{t^n}{(L + n)!}$$

Az egyenletet iterációs úton oldottuk meg. A további számításokat az ezen eljárással kapott becsléssel végeztük.

Megvizsgáltuk a Poisson-hipotézis teljesülését és a higitás-arányosságot, mindkettőt Chi-négyzet-próbával. Az előbbit minden higitásra külön a

$$\chi^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2}{\bar{x}}$$

próbatatisztikával, ahol x_j az adott higitás esetén a j -edik konténerekben kapott kolóniaszám, \bar{x} pedig ezek átlaga. Az utóbbit az

X_1, X_2, \dots, X_k higitásonkénti kolóniaszám-összegek alapján
(nullhipotézis: X_i eloszlása λ/d_i paraméterű Poisson-eloszlás)
a

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{n_i}{d_i} \frac{d_i}{n_i} X_i - \bar{x}}{\bar{x}}^2$$

próbat statisztikával, ahol

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^k X_i / \sum_{i=1}^k n_i / d_i$$

4. Vizsgálati faktorok

Amint említettük, az ÉBE becslését a vakcina értékmérésében szerepet játszó különféle faktorok is befolyásolják. Ezek közül a két legfontosabb: a higitási módszer és az általa elérhető pontosság, valamint a táptalaj minősége.

A higitás általában több fokozatban történik, így fontos annak eldöntése, hogy milyen higitási fokokban, hány lépéssel lehet optimális körülményeket biztosítani. A táptalaj minősége pedig meghatározza, hogy az egyes BCG-vakcinákban az élőbaktériumok mekkora hányada és milyen sebességgel szaporodik olyan mértékben, hogy látható és leszámítható kolóniákat képezzen.

A jelen vizsgálatok során kétféle higitási módszert hasonlítottunk össze:

1. A WHO által javasolt módszer (WHO): szériálisan két 50-szeres fokozat után a kapott 2500-szoros higitásból párhuzamosan 4, - 8, - 16 stb.-szeres fokozatok közül többet kiválasztunk oly módon, hogy legalább egy fokozatban "optimális" kolóniaszámot érjünk el.

2. Tízszeres higitási fokokból álló sorozat (10X): szériálisan négy 10-szeres fokozat után a kapott 10 ezerszeres higitásból párhuzamosan 2-, 4-, 8- stb-szeres fokozatok közül az előbbihez hasonló módon választunk.

Az összehasonlításra kerülő kétféle táptalaj: 1. Löwenstein-Jensen-féle táptalaj (L-J) és 2. olajsavas albuminos véres agar táptalaj (BOAA).

5. A matematikai analízis és a számítógépes algoritmus

Az összehasonlítások matematikai módszereként a többszemponos varianciaanalízist (ANOVA) választottuk. Az összehasonlításokat vizsgálati egységenként és ezen belül a különböző eredetű vakcinákra külön-külön végeztük el. Alapadatnak a cenzurált Poisson-eloszlás alapján kapott becslésünket tekintettük. Ahol az adatok száma és elrendezése ezt lehetővé tette, háromszempontos ANOVA-t végeztünk. A három faktor: a higitási módszer, a táptalaj és a vakcina gyártási sorozata (batch). Ily módon az értékmérési módszereket és a vakcina-minőséget együtt vizsgáltuk.

Azokon a helyeken, ahol nem állt rendelkezésre kellő mennyiségű adat, egy- illetve kétszemponos ANOVA-t végeztünk, a lehetőségeknek megfelelően.

Az analízist végző program a megfelelő ANOVA-módszert a következő algoritmus szerint választotta ki:

a.) Minden gyártási sorozathoz (batch) megállapítottuk, hogy a másik két faktor milyen kombinációjában állt rendelkezésre ÉBE-becslés.

b.) Ha több olyan batch volt, amelyekhez mindkét higitási módszerrel mindkét táptalajon történt ÉBE-meghatározás, akkor ezekkel a batch-ekkel háromszempontos ANOVA-t végeztünk.

c.) Ha csak egyetlen ilyen batch volt, akkor ezzel két szemponos ANOVA-t végeztünk (higitási módszer - táptalaj faktorokkal).

d.) Ha több olyan batch volt, amelyekhez valamelyik, de legalább egy batch-hez csak az egyik higitási módszerrel mindkét táp-

talajon történt ÉBE meghatározás, akkor ezekkel a batch-ekkel kétszemponos ANOVA-t végeztünk (batch - táptalaj faktorokkal). Ebbe az ANOVA-ba azokat a batch-eket is beszámítottuk, amelyek a b. vagy c. pontbeli ANOVA-ban szerepeltek.

e.) Ha csak egyetlen ilyen batch-et találtunk és egy táptalajon több ÉBE-meghatározás történt (pl. több ampullából), akkor erre a batch-re vonatkozóan a két táptalajt kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze.

f.) Hasonló módon végeztünk kétszemponos ANOVA-t (batch-higitási módszer faktorokkal), illetve kétmintás t-próbát, ahol csak egy táptalajon történt ÉBE meghatározás.

g.) Ha több olyan batch volt, amelyekhez valamelyik, de legalább egy batch-hez csak az egyik higitási módszerrel és táptalajon történt batch-enként több ÉBE-meghatározás, akkor ezekkel a batch-ekkel egyszemponos ANOVA-t végeztünk (az adott higitási módszerre és táptalajra vonatkozóan).

A fent vázolt algoritmus szerint tehát az adatok elrendezésétől függően egy anyagon belül több ANOVA-t is végeztünk. Egy adott batch-hez tartozó ÉBE-becslés többféle összehasonlító vizsgálatba is belekerülhetett. Pl. ha a B_1 , B_2 , B_3 batch-ekhez mindkét higitási módszerrel mindkét táptalajon történt ÉBE-becslés, akkor ezekkel háromszemponos ANOVA-t végeztünk. Ha emellett a B_4 , B_5 batch-ekhez csak a WHO-féle higitási módszerrel L-J táptalajon kaptunk adatokat, akkor a B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , B_5 batch-ekkel egyszemponos ANOVA-t is végeztünk.